AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
(VORSTEHER: PROFESSOR DR. R. DOERR)

Zur Auswertung filtrierbarer Virusarten durch die Methode der fortschreitenden Verdünnung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Ruth Ruppin

aus Jerusalem (Palästina).

BASEL
BUCHDRUCKEREI S. BRIN
1934

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt auf Antrag von *Prof. Dr. R. Doerr.*

Tag der Promotion: 30. Juni 1934.

Druckfertig.

Basel, den 4. Juli 1934.

Ludwig.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

R. Doerr und *S. Seidenberg*[1] haben gezeigt, daß die Titrierung der Infektiosität von zellfreiem Hühnerpestserum verschiedene Werte liefert, je nachdem man das Ausgangsmaterial bei Zimmertemperatur oder bei 0° C mit 0,85%iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Differenzen waren im allgemeinen nicht bedeutend und in verschiedenen Versuchen auch nicht gleich groß, aber stets gleichsinnig, indem die Verdünnung bei 0° C höhere Werte d. h. eine niedrigere minimal letale Infektionsdosis ergab. Eine Erhöhung der Verdünnungstemperatur von etwa 20° auf 37° C hatte eine stärkere Abnahme der titrierbaren Infektiosität zur Folge. Es wurde der Schluß gezogen, daß der beschriebene Effekt auf einer Abtötung oder irreversiblen Schädigung der Viruselemente durch die Verdünnungsflüssigkeit beruht und daß dieser Vorgang von zwei Faktoren abhängig ist, nämlich einerseits vom Grade der Verdünnung und andererseits von der Temperatur, bei welcher die Verdünnung vorgenommen wird.

Selbstverständlich gilt diese Erklärnng zunächst nur für die gewählte Verdünnungsflüssigkeit. Hierzu sei nachträglich bemerkt, daß die von *Doerr* und *Seidenberg*, wie auch von uns benützte Kochsalzlösung ein $p_H = 6{,}2$ hatte; sie war aus chemisch reinem NaCl und *sicher nicht oligodynamisch wirkendem destilliertem Wasser* hergestellt. Käufliches destilliertes Wasser hat bekanntlich oft Silber- oder Kupfergefäße (Kühler) passiert und ist dann für die Experimente der bezeichneten Art unbrauchbar. *Doerr* und *Seidenberg* gaben aber kurz an, daß man die gleichen Phänomene auch dann beobachtet, wenn man Hühnerpestserum mit einer *Phosphatpufferlösung* ($p_H = 7{,}6$) verdünnt und dieses (durch Versuchsprotokolle nicht belegte) Resultat erheischte eine Nachprüfung, um so mehr als *G. Pyl* mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche abweichende Ergebnisse erzielt hatte. Das genannte Virus verhält sich nämlich nach den Versuchen von *Pyl* nur beim Verdünnen mit Kochsalzlösung so wie Hühnerpestserum. Beim Verdünnen mit Phosphatpuffer ($p_H = 7{,}6$) kehren sich dagegen die Temperaturbeziehungen um, die Titrierung bei 0° C liefert niedrigere Werte als die Titrierung bei etwa 20° C.

[1] *Doerr, R.* und *S. Seidenberg:* Z. Hyg. **115**, 194 (1933)

Vorerst sei eines der zahlreichen Experimente wiedergegeben, in welchen Hühnerpestserum (frisch von einem moribunden Huhn gewonnen) *mit Phosphatpufferlösung* (p_H = 7,6) fortschreitend verdünnt wurde und zwar

1. bei Zimmertemperatur (20° C);
2. bei 0° C (eisgekühlte Verdünnungsflüssigkeit, eisgekühlte Pipetten;
3. wie sub 2 bei 0° C, nur mit dem Unterschiede, daß die hergestellten Verdünnungen zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehenblieben, bevor sie auf Hühner verimpft wurden.

Von jeder Verdünnung wurde 1,0 ccm mit besonderer Spritze auf ein Huhn intramuskulär (Pectoralis) übertragen.

I.

Serum-verdünnung	Verdünnung bei 20° C	Verdünnung bei 0° C	Verdünnung bei 0° C verimpft nach 2stündigem Stehen bei 20° C
1 : 8 000	—	—	† 36 Std.
1 : 16 000	—	—	† 36 „
1 : 32 000	† 48 Std.	—	† 36 „
1 : 64 000	† 48 „	† 36 Std.	† 48 „
1 : 128 000	† 36 „	† 42 „	† 36 „
1 . 256 000	überlebt	† 36 „	überlebt
1 : 512 000	„	† 36 „	„
1 : 1 024 000	„	überlebt	„
1 : 2 048 000	„	† 42 „	—
1 : 4 096 000	—	† 48 „	—

Das Verdünnen mit Phosphatpuffer bei 0° C ergab also in der Tat einen höheren Wert als die Titrierung bei 20° C; die Differenz betrug mindestens das 32fache. Ein prinzipieller Unterschied gegenüber dem Verdünnen mit Kochsalzlösung — wie ihn *G. Pyl* für das Virus der Maul- und Klauenseuche beschrieben hat — war nicht vorhanden. Man sollte daher (im Sinne der von *Doerr* und *Seidenberg* gegebenen Erklärung) annehmen, daß die Elemente des Hühnerpestvirus durch die beiden Verdünnungsflüssigkeiten in gleichem Ausmaße geschädigt werden, was aber a priori unwahrscheinlich ist und mit unseren Beobachtungen auch nicht übereinstimmt. Die Phosphatpufferlösung greift das Virus zweifellos nicht so stark an wie die Kochsalzlösung, wie die nachstehenden Versuche deutlich erkennen lassen.

II.

Ein und dieselbe Probe Hühnerpestserum wird bei 20° C parallel mit NaCl und Phosphatpuffer titriert; die Auswertung ergibt:

Serum-verdünnung	Verdünnung mit NaCl	Verdünnung mit Phospat-puffer	Serum-verdünnung	Verdünnung mit NaCl	Verdünnung mit Phosphat-puffer
1 : 32 000	überlebt	† 36 Std.	1 : 1 024 000	überlebt	überlebt
1 : 128 000	„	† 48 „	1 : 2 048 000	„	„
1 : 512 000	„	† 60 „			

III.

Von ein und derselben Probe Hühnerpestserum werden zwei 100fache Verdünnungen mit NaCl und mit Phosphatpuffer hergestellt; nach sechstägigem Stehen im Eisschrank ergibt die Auswertung der minimal letalen Infektionsdosis (bezogen auf das Ausgangsserum)

für die 100fache NaCl Verdünnung 0,001 ccm,
für die 100fache Phosphatverdünnung 0,00002 ccm.

Wie soll man sich diese Widersprüche zurechtlegen? Aus Versuch III geht hervor, daß 100fache Serumverdünnungen — gleichgültig, ob sie mit NaCl oder Phosphatpuffer hergestellt werden — noch nach einer Woche stark infektiös sind, wenn sie bei Eisschranktemperatur aufbewahrt werden. Bei Zimmertemperatur und in etwas höheren Verdünnungen (1 : 1000) erfolgt die Abnahme des Virusgehaltes zwar rascher, aber nie kritisch, sondern allmählich d. h. so, daß der Titer sukzessiv absinkt, wovon wir uns durch fortlaufende Auswertungen überzeugen konnten. Die komplette Zerstörung (Inaktivierung) des Virus erfordert unter den genannten Bedingungen jedenfalls Tage bis Wochen und dieses verzögerte Tempo steht damit in Einklang, daß man den Verdünnungsflüssigkeiten nur schwache virulicide Eigenschaften zuzuschreiben vermag, kollidiert aber scheinbar mit dem geschilderten Verdünnungseffekt bzw. mit seiner Abhängigkeit von der Verdünnungstemperatur. Wenn man Hühnerpestserum bei 0° und 20° C fortschreitend verdünnt und die Verdünnungen sofort auf Hühner verimpft, benötigt man, falls alles richtig vorbereitet wurde, für die Durchführung der ganzen Reihenversuche nicht mehr als höchstens 10—15 Min.; und doch ergibt die Auswertung bei 20° C eine konstante und außerhalb der Fehlergrenzen des Verfahrens liegende Abnahme der Infektiosität. Die Verdünnungsflüssigkeiten scheinen also in diesem Falle nicht wie

schwache, sondern *wie starke keimschädigende Agenzien* zu wirken, *bei welchen die Einwirkungsdauer keine oder nur eine ganz untergeordnete Rolle spielt.* Die Unabhängigkeit der Virusinaktivierung von der Einwirkungsdauer erhellt übrigens auch aus Versuch I, in welchem der gleiche Titer erzielt wurde, gleichgültig, ob die Auswertung binnen wenigen Minuten bei 20° C vorgenommen wurde oder ob man die bei 0° C angesetzten Dilutionen zwei Stunden bei 20° C stehen ließ. Man gelangt zu einem Verständnis dieser eigenartigen Beobachtungen, wenn man sich über den Wirkungsmechanismus der beiden von *Doerr* und *Seidenberg* angeschuldigten Faktoren (Verdünnungstemperatur und Verdünnungsgrad) Rechenschaft abzulegen versucht. Daß die Temperatursteigerung den schädigenden Effekt erhöht, bedarf als allgemein gültige Regel keines speziellen Kommentars. Weniger einfach liegen die Verhältnisse für den dominierenden Einfluß des Verdünnungsgrades. *Doerr* und *Seidenberg* nahmen an, daß durch die fortschreitende Verdünnung ein adäquates (das Virus optimal konservierendes) Medium (Blutserum einer empfänglichen Tierspezies) in steigendem Maße durch ein schädliches substituiert wird. Das genügt jedoch nicht und zwar aus dem einfachen Grunde, weil die Verdünnungsgrenze, bei welcher die Viruszerstörung durch höhere Temperatur einsetzt, von einer Serumprobe zur andern erheblich variieren kann; sie lag in manchen Versuchen bei 1 : 8000 in anderen bei 1 : 64000 bis 1 : 1 000 000. Die Verdünnung muß also noch auf andere Weise zur Geltung kommen, als durch die bloße Reduktion der schützenden Serumstoffe.

Nun wurde bereits erwähnt, daß die Inaktivierung des Virus in NaCl oder Phosphatpuffer nicht plötzlich, sondern allmählich erfolgt. Daraus geht unmittelbar hervor, daß die Viruselemente (deren Durchmesser von *Elford* und *Todd* auf 60—90 $\mu\mu$ von *Bechhold* und *Schlesinger* auf 120 $\mu\mu$ geschätzt wird) eine individuell variable Widerstandsfähigkeit gegen den schädigenden Einfluß der Verdünnungsmittel besitzen müssen. Offenbar sind ferner die resistenten Elemente im Hühnerpestserum in relativ kleinem Prozentsatz vertreten. Schon das Absinken der Infektiosität auf ein Hundertstel des ursprünglichen Wertes bedeutet ja die irreversible Schädigung von je 99 Exemplaren vom Hundert der Gesamtzahl, positiv ausgedrückt das Überleben eines einzigen von je 100 Keimen. Durch die Verdünnungsprozedur werden daher

die resistenten Elemente zuerst reduziert und schliesslich ganz ausgeschaltet, die hinfälligen erst später d. h. bei höheren Verdünnungsgraden und dieser Verdünnungsbereich — der natürlich vom Virusgehalt des Ausgangsmaterials abhängt — ist es, innerhalb dessen der Einfluß der Temperatur der Verdünnungsflüssigkeit nachweisbar wird.

Eine andere Erklärung, welche die Verdünnungsphänomene ihres paradoxen Charakters entkleiden könnte, scheint uns — selbst wenn man zu willkürlichen Hilfshypothesen greifen wollte — derzeit nicht möglich zu sein. Jedenfalls harmoniert die hier vorgetragene Auffassung mit der Tatsache, daß die Haltbarkeit des Hühnerpestvirus in NaCl oder Phosphatpuffer vom Verdünnungsgrade abhängt.

IV.

Von einer Probe Hühnerpestserum wurde mit *Phosphatpuffer* ($p_H = 7{,}6$) 100fach und tausendfach verdünnt. Beide Verdünnungen blieben im Eisschrank stehen. Die fortlaufende Auswertung der Infektiosität der 100fachen Verdünnung ergab (bezogen auf das Ausgangsserum) folgende Grenzwerte:

Sofort nach der Herstellung: 1 : 128000, nach 64 Stunden: 1 : 128000, nach 6 Tagen: 1 : 128000, nach 10 Tagen: 1 : 64000.

Der Titer der 1000fachen Verdünnung betrug dagegen nach 8 Tagen unter sonst identischen Bedingungen nur noch 1 : 2000.

V.

In einer auf Eis gehaltenen *100fachen NaCl-Verdünnung* sank der Titer binnen 6 Tagen von 1 : 256000 auf 1 : 1000.

Derartige Untersuchungen über die Haltbarkeit des Hühnerpestvirus erfordern einen sehr grossen Aufwand an teuren Versuchstieren, namentlich wenn sie an derselben Serumprobe unter Variierung aller in Betracht kommenden Faktoren (verschiedene Suspensionsflüssigkeiten, verschiedene Verdünnungsgrade und verschiedene Temperaturen) komparativ ausgeführt werden sollen. Hinderlich ist ferner der Umstand, daß man den Titer frisch gewonnener Hühnerpestsera von vornherein nicht kennt, sondern ganz vom Zufall abhängig ist; der Titer solcher Sera kann zwischen 10^{-2} und 10^{-6} ccm schwanken (*Doerr*, *Seidenberg* und *Whitmann*), so daß oft zahlreiche Einzelexperimente nutzlos angesetzt werden. Die Abhängigkeit der Konservierungsdauer von Verdünnungsgrad und von der Temperatur wurde daher nicht so vollständig ge-

prüft, daß die Ergebnisse ausreichen, um die Erklärung der Verdünnungsphänomene völlig exakt zu beweisen. Unerledigt blieb ferner auch die wichtige Frage, wie sich Serumvirus im Konservierungs- und im Verdünnungsversuch (bei 0° und 20° C) verhält, wenn man als Verdünnungsflüssigkeit Normal-Hühnerserum verwendet. Vielleicht lassen sich diese Lücken später ausfüllen. Vorläufig genügt die Feststellung, daß das Serumvirus ceteris paribus in Kochsalzlösung schneller zerstört wird als in Phosphatpufferlösung ($p_H = 7{,}6$), während beide Flüssigkeiten im Verdünnungsversuch bei 0° und 20° analoge Wirkungen entfalten. — Im zweiten Fall ist eben (innerhalb bestimmter Grenzen!) nicht der Grad der viruliziden Fähigkeit des Suspensionsmittels entscheidend, sondern der Verdünnungsgrad des Virus im Vereine mit der Temperatur, bei welcher sich der Vorgang vollzieht. Absolut „bland" ist natürlich auch eine Phosphatpufferlösung ($p_H = 7{,}6$) nicht und Änderungen des p_H zwischen 7,2 und 7,9 ergaben keine besseren Resultate.

Wodurch die verschiedene Widerstandsfähigkeit der Viruselemente bedingt ist, lässt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Sind die Elemente lebende Mikroben, so könnte man die Analogie mit den „Absterbeordnungen" der Bakterien heranziehen, wie sie bei der Einwirkung schwacher Desinfektionsmittel beobachtet werden. *Landsteiner* und *Russ* sowie *Ostertag* und *Rugge* haben bekanntlich schon vor geraumer Zeit festgestellt, daß Hühnerpestvirus gegenüber einigen keimschädigenden Agenzien (Hitze, Saponin, chemischen Substanzen) eine innerhalb weiter Grenzen schwankende Resistenz zeigt. Die Unterschiede waren besonders auffällig, wenn virushaltige Substrate verschiedener Art z. B. Blutserum, Hirnemulsion, Leberextrakte usw. miteinander verglichen wurden und *v. Prowacek* vermutete daher, daß das Virus im Organismus des Huhnes in zwei Modifikationen auftreten kann, von denen sich die resistentere in den Organen, die minder widerstandsfähige in der Zirkulation vorfindet. Diese Annahme ist jedoch nicht gerechtfertigt, da spätere Untersuchungen ergaben, daß die Resistenz des Virus von der Beschaffenheit der Partikel abhängt, an welche die Viruselemente adsorbiert sind; so kann man z. B. die Widerstandsfähigkeit von Serumvirus beträchtlich erhöhen, wenn man es an normale Meerschweinchenerythrocyten bindet (*Doerr* und *R. Pick*). *Doerr* und seine Mitarbeiter arbeiteten allerdings stets mit dem gleichen Material, nämlich mit Hühner-

pestserum. Es ist aber natürlich möglich, daß die Viruselemente auch im Hühnerserum nicht durchwegs „frei suspendiert" sondern zum Teil an Eiweißteilchen adsorbiert sind oder daß umgekehrt Eiweißteilchen an den Viruselementen adhärieren. Die sorptive Verbindung mit Serumeiweiß könnte die Viruselemente gegen virulizide Einflüsse schützen und Resistenzunterschiede der im gleichen Serum enthaltenen Viruselemente im Prinzip verständlich machen.

Nach den Untersuchungen von *G. Pyl* zeigt das Virus der Maul- und Klauenseuche insofern ähnliche Eigenschaften wie das Virus der Hühnerpest, als es in verdünnten Suspensionen weit rascher zerstört bzw. inaktiviert wird wie in konzentrierten und zwar auch dann, wenn man als Verdünnungsflüssigkeit die (von *Pyl* als optimal bezeichnete) Phosphatpufferlösung ($p_H = 7{,}6$) benützt. *Pyl* nimmt aber an, daß das Virus der Maul- und Klauenseuche im Ausgangsmaterial größere Aggregate bildet, die aus einer „wechselnden Zahl von Erregern" zusammengesetzt sind und mit steigender Verdünnung sukzessive in die eigentlichen Elemente zerfallen. Die Oberfläche der Viruspartikel müßte dann im Verhältnis zu ihrem Volum zunehmen und mit der Oberflächenentfaltung würde der schädigende Einfluß des umgebenden Suspensionsmittels wachsen. Auf das Virus der Hühnerpest, wie es im Serum des infizierten Huhnes vorhanden ist, läßt sich jedoch diese Deutung, wie bereits *Doerr* und *Seidenberg* betonten, nicht anwenden, weil derzeit alle Anhaltspunkte fehlen, welche für einen vom Verdünnungsgrad und von der Temperatur abhängigen Verteilungszustand sprechen würden. Damit erledigt sich — wenigstens vorläufig — auch die Konzeption, daß das Virus der Hühnerpest als ein nichtorganisiertes Kolloid *von variabler Dispersität* aufzufassen ist.

Zusammenfassung.

1. Die Erscheinung, daß die quantitative Bestimmung der Infektiosität von Hühnerpestserum durch die Verdünnungsmethode ja nach der Temperatur, bei welcher die Verdünnung vorgenommen wird, verschiedene Resultate liefert (*Doerr* und *Seidenberg*) wurde bestätigt und näher analisiert.

2. Es zeigte sich, daß durch die Verdünnung bei 0° C stets ein höherer Titer erzielt wird, als durch die Verdünnung bei 20° C, d. h. mit anderen Worten, daß durch die Verdünnung bei 20° C die höchsten Verdünnungen, in welchen das Virus noch vorhanden

sein sollte, unwirksam werden. Der Effekt trat ein, gleichgültig, ob als Verdünnungsflüssigkeit Kochsalzlösung ($p_H = 6{,}2$) oder Phosphatpufferlösung ($p_H = 7{,}6$) benützt wurde, obwohl die erstgenannte Flüssigkeit stärker virulizid wirkte als die zweite.

3. Da sich das Virus in beiden Flüssigkeiten geraume Zeit konservieren läßt, wenn man das Ausgangsmaterial (Hühnerpestserum) nicht zu stark verdünnt (z. B. nur 100fach), konnte die beobachtete Wirkung nur auf die hohen Verdünnungsgrade bezogen werden.

4. Der Einfluß der Verdünnung kann nicht ausschließlich auf der Ausschaltung der Proteine oder anderer Stoffe des Hühnerserums beruhen, da die Inaktivierung des Virus durch Zimmertemperatur in verschiedenen Proben von Hühnerpestserum bei verschiedenen Verdünnungsgraden einsetzt. Dagegen lassen sich die beschriebenen Erscheinungen durch die Annahme befriedigend erklären, daß die Elemente des Virus in der gleichen Probe verschiedene Resistenz besitzen und daß die resistenten Elemente in der Minderzahl vertreten sind.

Literaturverzeichnis.

Bechhold, H. und M. Schlesinger: Z. Hyg. **112**, 668 (1931). — Biochem. Z. **236**, 387 (1931). — *Doerr, R.* und *Pick:* Zbl. Bakter. I Orig. **76**, 476 (1915). — *Doerr, R., S. Seidenberg* und *Whitman*: Z. Hyg. **112**, 732 (1931). — *Doerr R.* und *S. Seidenberg*: Z. Hyg. **115**. 194 (1933). — *Elford, W. J.* und *Todd:* Brit. J. exper. Path. **14**, 240 (1933). — *Landsteiner* und *Russ:* Arch. Hyg. **59**, 286 (1906). — *Ostertag* und *Bugge:* Z. Infkrkh. Haustiere **2**, 45 (1906). — *v. Prowacek:* Münch. med. Wschr. **1908**, 165. — *Pyl, G.:* Z. Hyg. **114**, 501 (1932; **115**, 541 (1933).